

- AN - 1994-268688 [33]  
 AP - JP19920349633 19921228; [Previous Publ. JP6197778 ] ; JP19920349633  
 19921228  
 CPY - TORA  
 DC - B05 D16  
 FS - CPI  
 IC - C12P9/00  
 MC - B05-B01P D05-C D05-H  
 M2 - [01] B415 B701 B713 B720 B815 B831 H7 H721 J0 J011 J1 J171 M280 M312  
 M321 M331 M340 M342 M349 M381 M391 M411 M510 M520 M530 M540 M720 M903  
 M904 N132 N512 Q233; R03160-P  
 PA - (TORA ) TORAY IND INC  
 PN - JP3151982B2 B2 20010403 DW200121 C12P9/00 004pp  
 - JP6197778 A 19940719 DW199433 C12P9/00 004pp  
 PR - JP19920349633 19921228  
 XA - C1994-122515  
 XIC - C12P-009/00 ; (C12P-009/00 C12R-001/865) ; (C12P-009/00 C12R-001/85) ;  
 (C12P-009/00 C12R-001/78) ; (C12P-009/00 C12R-001/84) ; (C12P-009/00  
 C12R-001/72) ; (C12P-009/00 C12R-001/73) ; (C12P-009/00 C12R-001/88) ;  
 (C12P-009/00 C12R-001/865) ; (C12P-009/00 C12R-001/85) ; (C12P-009/00  
 C12R-001/78) ; (C12P-009/00 C12R-001/84) ; (C12P-009/00 C12R-001/72) ;  
 (C12P-009/00 C12R-001/73) ; (C12P-009/00 C12R-001/88)  
 AB - J06197778 The prepn. of phosphoenol pyruvate (PEP) comprises culture  
 of a yeast of *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Candida* or *Torulopsis*  
 genus is used to form and accumulate PEP from a carbon source which  
 can be assimilated by the yeast, and then it is isolated and collected.  
 - PEP can be isolated from the reaction liquid by reverse osmosis,  
 concn. and crystallisation.  
 - USE/ADVANTAGE - PEP is a high energy phosphate cpd. and is an  
 essential and important cpd. for the regeneration system of adenosine  
 triphosphate. The method can prepare PEP under mild conditions with no  
 complex operation.  
 - In an example, one platinum loop of *Torulopsis glabrata* IFO0822 was  
 inoculated to a medium contg. 0.5% glucose, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05%  
 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1.0% peptone and 0.1% yeast extract and cultured at 30  
 deg.C for 24 hrs.. Then, the culture was centrifuged and the microbe  
 cells were added to 60 ml of a reaction liquid contg. 1% glucose, 9%  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O and 5 mM ATP and reacted at 30 deg.C for 30  
 hrs..(Dwg.0/0)  
 C - C12P9/00 C12R1/865  
 - C12P9/00 C12R1/85  
 - C12P9/00 C12R1/78  
 - C12P9/00 C12R1/84  
 - C12P9/00 C12R1/72  
 - C12P9/00 C12R1/73  
 - C12P9/00 C12R1/88  
 - C12P9/00 C12R1/865  
 - C12P9/00 C12R1/85  
 - C12P9/00 C12R1/78  
 - C12P9/00 C12R1/84  
 - C12P9/00 C12R1/72



4/7/1  
DIALOG(R)File 352:DERWENT WPI  
(c) 2000 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

010000977    \*\*Image available\*\*

WPI Acc No: 1994-268688/199433

Simple prepn. of phosphoenol pyruvate - by culture of Saccharomyces,  
Hansenula, Pichia, Candida or Torulopsis yeast

Patent Assignee: TORAY IND INC (TORA )

Number of Countries: 001    Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 6197778	A	19940719	JP 92349633	A	19921228	199433 B

Priority Applications (No Type Date): JP 92349633 A 19921228

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 6197778	A		4	C12P-009/00	

Abstract (Basic): JP 6197778 A

The prepn. of phosphoenol pyruvate (PEP) comprises culture of a yeast of Saccharomyces, Hansenula, Pichia, Candida or Torulopsis genus is used to form and accumulate PEP from a carbon source which can be assimilated by the yeast, and then it is isolated and collected.

PEP can be isolated from the reaction liquid by reverse osmosis, concn. and crystallisation.

USE/ADVANTAGE - PEP is a high energy phosphate cpd. and is an essential and important cpd. for the regeneration system of adenosine triphosphate. The method can prepare PEP under mild conditions with no complex operation.

In an example, one platinum loop of Torulopsis glabrata IF00822 was inoculated to a medium contg. 0.5% glucose, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1.0% peptone and 0.1% yeast extract and cultured at 30 deg.C for 24 hrs.. Then, the culture was centrifuged and the microbe cells were added to 60 ml of a reaction liquid contg. 1% glucose, 9% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O and 5 mM ATP and reacted at 30 deg.C for 30 hrs..

Dwg.0/0

Derwent Class: B05; D16

International Patent Class (Main): C12P-009/00

International Patent Class (Additional): C12P-009/00; C12R-001-865;

C12R-001-85; C12R-001-78; C12R-001-84; C12R-001-72; C12R-001-73;

C12R-001-88



(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-197778

(43)公開日 平成6年(1994)7月19日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 9/00		7432-4 B		
/( C 1 2 P 9/00				
C 1 2 R 1:865 )				
( C 1 2 P 9/00				
C 1 2 R 1:85 )				
審査請求 未請求 請求項の数 1			(全 4 頁)	最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-349633

(22)出願日 平成4年(1992)12月28日

(71)出願人 000003159

東レ株式会社

東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

(72)発明者 宮田 令子

愛知県名古屋市港区大江町9番地の1 東レ  
株式会社名古屋事業場内

(72)発明者 米原 徹

愛知県名古屋市港区大江町9番地の1 東レ  
株式会社名古屋事業場内

(54)【発明の名称】ホスホエノールビルビン酸の製造方法

(57)【要約】

【構成】 サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、ハンゼヌラ (*Hansenula*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属またはトルロプシス (*Torulopsis*) 属に属する酵母の培養物を用いて、前記酵母の資化し得る炭素源よりホスホエノールビルビン酸を生成蓄積せしめ、これを単離採取することを特徴とするホスホエノールビルビン酸の製造方法。

【効果】 酵母の生産する炭素源資化酵素系を用いて、炭素源よりホスホエノールビルビン酸を温和な条件下で煩雑な操作を要することなく製造することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、ハンゼヌラ (*Hansenula*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属またはトルロブシス (*Torulopsis*) 属に属する酵母の培養物を用いて、前記酵母の資化し得る炭素源よりホスホエノールビルビン酸を生成蓄積せしめ、これを単離採取することを特徴とするホスホエノールビルビン酸の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、酵母の生産する炭素源資化酵素系を用いて炭素源よりホスホエノールビルビン酸を生成蓄積せしめ採取する方法に関する。

【0002】ホスホエノールビルビン酸（以下PEPと略す）は高エネルギーリン酸化化合物であり、アデノシン三リン酸（ATP）の再生系には必須かつ重要な化合物である。

## 【0003】

【従来の技術】PEPの化学合成は古くから公知（Chem. Rev., Vol. 61, 607 (1961)）であり、生化学的手段によりPEPを生成させる方法としては、デバリオマイセス (*Debaryomyces*) 属の乾燥菌体を用いる方法（J. Ferment. Technol., Vol. 65, 225 (1987)）が知られている。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、化学合成は収率、収量が低く、また乾燥菌体による酵素法は、乾燥菌体調整など、操作が煩雑であるという問題があった。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、収率、収量が高くかつ操作が簡便なPEPの製造方法について鋭意検討した結果、以下の本発明に到達した。

【0006】すなわち、本発明は、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、ハンゼヌラ (*Hansenula*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属またはトルロブシス (*Torulopsis*) 属に属する酵母の培養物を用いて、前記酵母の資化し得る炭素源よりホスホエノールビルビン酸を生成蓄積せしめ、これを単離採取することを特徴とするホスホエノールビルビン酸の製造方法である。

【0007】本発明において使用され得る酵母としては、サッカロミセス属、ハンゼヌラ属、ピキア属、トルロブシス属、キャンディダ属に属する酵母であれば、いかなるものも使用できる。このうち、各種炭素源資化能力の高いものが好ましく使用できる。好ましい酵母の具体例としては、たとえば、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) (I

10

FO 0213、0538、1950)、サッカロミセス・クルイベリ (*Saccharomyces kluyveri*) (IFO 1982)、ハンゼヌラ・グルコザイマ (*Hansenula glucozyma*) (IFO 1472)、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) (IFO 0948)、キャンディダ・メタノリカ (*Candida methanolica*) (ATCC 26175)、キャンディダ・リポリティカ (*Candida lipolytica*) (IFO 717)、トルロブシス・ピナス (*Torulopsis pinus*) (IFO 0741)、トルロブシス・グラブラータ (*Torulopsis glabrata*) (IFO 0622) などが挙げられる。

【0008】本発明においては、酵母の培養物を用いる。培養物は上記酵母を適当な栄養培地に培養することによって調整できる。これらの酵母を培養するための培地としては、通常の天然あるいは合成培地が用いられるが、好ましくはアミノ酸を適当に含んだ天然培地が良好に用いられる。

【0009】本発明で用いる酵母の培養物の形態は任意であり、酵母の培養した培養物そのもの、培養された生菌体、真空乾燥菌体、凍結乾燥菌体、有機溶媒による乾燥菌体などの乾燥菌体、処理菌体などが本発明の範囲に含まれる。このうち、工業的には酵母を栄養培地に培養した培養物そのもののが有利に用いられる。

【0010】ビルビン酸生成原料である炭素源としては、本発明で使用する酵母が資化し得るものであればいかなるものでもよい。好ましい炭素源の具体例としては、グルコース、フラクトース、シュクロース、マンノース、マンニトール、キシロース、ガラクトース、糖蜜、ソルビトール、グリセリンなどの糖もしくは糖アルコール、酢酸、クエン酸、乳酸などの有機酸、メタノール、エタノール、プロパノールなどのアルコール類、その他炭化水素などを挙げることができる。糖もしくは糖アルコールを用いることにより、より好ましい結果を得ることができる。

【0011】本発明で使用する酵母の培養物の量は、乾燥菌体濃度に換算して1~50g/lが好ましく、より好ましくは5~20g/lの範囲である。

【0012】また、生成蓄積系中の酵素反応はATP、マグネシウムイオン、カリウムイオンおよびリン酸を必要とするものが多く、ATPが0.1mM~15mM、好ましくは1mM~5mMであり、MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>Oが0.01~0.2%、好ましくは0.02~0.1%であり、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>が3~14%、好ましくは6~13%の濃度で用いられるのが通常である。

【0013】生成蓄積反応中是有機酸の生成に伴ってpHの低下が生じるので、炭酸カルシウムまたは苛性カリなどのアルカリで通常pH5~10、好ましくは7~9に調節することがホスホエノールビルビン酸生産のため

50

には有効である。

【0014】反応中の温度は20～37℃、好ましくは25～32℃が適当である。

【0015】反応終了後、生成蓄積系中に生成蓄積したホスホエノールビルビン酸は逆浸透膜などを使い、ホスホエノールビルビン酸とリン酸を分離し、水酸化アルカリを加え、ホスホエノールビルビン酸のアルカリ金属塩水溶液とし、濃縮・晶析により単離できる。

【0016】

【実施例】以下、実施例によって本発明を説明する。 10

【0017】実施例において生成したビルビン酸の確認と定量は、高速液体クロマトグラフィー、ビルバートキナーゼと乳酸デヒドロゲナーゼを用いる酵素法などにより行った。以下の分析結果については上記両分析法ともよく合致しており、同じ分析数値を示した。

\*

表 1

菌 株	PEP蓄積量(g/g)
サッカロミセス・セレビスエ IFO 0538	1.8
IFO 0213	2.3
サッカロミセス・クルイベリ IFO 1892	1.0
ハンゼヌラ・グルコザイマ IFO 1472	0.7
ピキア・パストリス IFO 0948	0.5
キャンディダ・メタノリカ ATCC 26175	1.3
キャンディダ・リボリティカ IFO 0717	0.9
トルロブシス・ピナス IFO 0741	1.5
トルロブシス・グラブラータ IFO 0622	3.2

【0021】実施例2

※に示す。

実施例1で用いた反応液の炭素源を表2に示す炭素源に

【0022】

おきかえ、表2に示す菌株を用いて培養した結果を表2※

【表2】

表 2

菌 株	炭 素 源 濃 度	PEP蓄積量(g/g)
サッカロミセス・セレビスエ IFO 0213	シュクロース2%	2.1
サッカロミセス・クルイベリ IFO 1892	シュクロース2%	1.5
キャンディダ・メタノリカ ATCC 26175	メタノール2%	0.3 <sup>※</sup>
トルロブシス・グラブラータ IFO 0622	ソルビトール2%	2.7

※培養もグルコース0.5%に代えてメタノール0.5%を使用した。

【0023】

50 【発明の効果】本発明によれば、酵母の生産する炭素源

資化酵素系を用いて、炭素源よりホスホエノールピルビン酸を温和な条件下で煩雑な操作を要することなく製造\*  
\*することができる。

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
(C 1 2 P 9/00				
C 1 2 R 1:78)				
(C 1 2 P 9/00				
C 1 2 R 1:84)				
(C 1 2 P 9/00				
C 1 2 R 1:72)				
(C 1 2 P 9/00				
C 1 2 R 1:73)				
(C 1 2 P 9/00				
C 1 2 R 1:88)				